

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

AVENTIS CROPSOURCE GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 27 March 2000 (27.03.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 1998/M206 NP	
International application No. PCT/EP99/03141	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

## Name and Address

HOECHST SCHERING AGREVO GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069-305-82808

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☒ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

## Name and Address

AVENTIS CROPSOURCE GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069-305-82808

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

**Please also note the change of name in the correspondence address.**

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

## Authorized officer

G. Bähr

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNEDate of mailing (day/month/year)  
04 August 2000 (04.08.00)Applicant's or agent's file reference  
1998/M206 NP

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/EP99/03141International filing date (day/month/year)  
07 May 1999 (07.05.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

## Name and Address

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

## Name and Address

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Brüningstrasse 50  
D-65929 Frankfurt  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

A. Karkachi

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 December 1999 (06.12.99)	Applicant's or agent's file reference 1998/M206 NP
International application No. PCT/EP99/03141	
International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)	Priority date (day/month/year) 08 May 1998 (08.05.98)
Applicant LÖRZ, Horst et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 12 November 1999 (12.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer C. Cupello Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM.  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> C12N 15/56, 9/44, 15/82, 1/21, 5/10, A01H 5/00, 5/10, C08B 30/00		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 99/58690
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 18. November 1999 (18.11.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/03141 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 7. Mai 1999 (07.05.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 20 608.9 ✓ 8. Mai 1998 (08.05.98) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HOECHST SCHERING AGREVO GMBH [DE/DE]; Mirastrasse 54, D-13509 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> LÖRZ, Horst [DE/DE]; Ramckeweg 6a, D-22589 Hamburg (DE). LÜTTICKE, Stephanie [DE/DE]; Lange Reihe 22, D-20099 Hamburg (DE). ABEL, Gernot [DE/DE]; Papendamm 28, D-20146 Hamburg (DE). GENSCHEL, Ulrich [DE/DE]; Eimsbütteler Strasse 100b, D-22769 Hamburg (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID MOLECULES WHICH CODE FOR ENZYMES DERIVED FROM WHEAT AND WHICH ARE INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF STARCH			
<b>(54) Bezeichnung:</b> NUCLEINSÄUREMOLEKÜLE CODIEREND ENZYME AUS WEIZEN, DIE AN DER STÄRKESYNTHESE BETEILIGT SIND			
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to nucleic acid molecules which code for enzymes and which are involved in the synthesis of starch in plants. These enzymes concern isoamylases derived from wheat. The invention also relates to vectors and host cells which contain the described nucleic acid molecules, especially transformed plant cells and plants which can be regenerated therefrom, which exhibit an increased or reduced activity of the inventive isoamylases.			
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Isoamylasen aus Weizen. Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der erfindungsgemäßen Isoamylasen aufweisen.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Nucleinsäuremoleküle und Enzym aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind**

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym aus Weizen codieren, das an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Isoamylase.

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren, Wirtszellen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen enthalten.

Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Hierbei ist Weizen eine der wichtigsten Kulturpflanzen, da ca. 20 % der Gesamtstärkeproduktion der Europäischen Gemeinschaft aus ihr gewonnen werden.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen

Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten und deren Kettenlängen unterscheiden, die darüber hinaus derivatisiert, z.B. phosphoryliert sein können. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylosestärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In Weizen besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 11 bis 37 % aus Amylose-Stärke.

Um eine möglichst vielfältige Anwendung von geeigneten Stärken für unterschiedlichste industrielle Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärken zu synthetisieren, die für verschiedene Verwendungszwecke besonders gut geeignet sind. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht in züchterischen Maßnahmen. Die züchterischen Einflußnahme erweist sich beim Weizen aufgrund seines polyploiden Charakters (tetra- und hexaploid) jedoch sehr schwer. Erst kürzlich gelang durch Kreuzung natürlich auftretender Mutanten die Herstellung eines "waxy" (Amylose-freien) Weizens (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253-259).

Eine Alternative zu züchterischen Verfahren besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden.

Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der diese Enzyme codierenden Nucleinsäuremoleküle.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärk führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärke-speichernden Geweben die Amyloplasten.

Für eine weitere gezielte Veränderung des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere an der Einführung oder am Abbau von Verzweigungen innerhalb der Stärkemoleküle, beteiligt sind.

Neben den sog. Q-Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet und werden entsprechend ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt:

- (a) Die Pullulanasen, die neben Pullulan auch Amylopektin als Substrat nutzen, kommen in Mikroorganismen, z.B. *Klebsiella*, und in Pflanzen vor. In Pflanzen werden diese Enzyme auch als R-Enzyme bezeichnet.
- (b) Die Isoamylasen, die nicht Pullulan, wohl aber Glycogen und Amylopektin als Substrat nutzen, kommen ebenfalls in Mikroorganismen und Pflanzen vor. Isoamylasen wurden beispielsweise in Mais (Manners & Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) und Kartoffel (Ishizaki et al., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771-779) beschrieben.
- (c) Die Amylo-1,6-Glucosidasen sind in Säugern und Hefen beschrieben und nutzen Grenzdextrine als Substrat.

In Zuckerrüben konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) neben fünf Endo- und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym vom Pullulanase-Typ nachgewiesen werden. Dieses Enzym, das eine Größe von ca. 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten

lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben, das Pullulan als Substrat verwendet. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat, eine 5-fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284).

Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärke-speichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (J. Chem. Soc., (1951), 1451) untersucht. Es gelang der Nachweis, daß das entsprechende Enzym im Gegensatz zum Q-Enzym keine kettenverlängernde Aktivität besitzt, sondern lediglich  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Das Enzym konnte jedoch bisher nicht genauer charakterisiert werden. Im Fall der Kartoffel wurden bereits Verfahren zur Reinigung des Debranching-Enzyms sowie partielle Peptidsequenzen des gereinigten Proteins vorgeschlagen (WO 95/04826). Für Spinat wurde inzwischen die Reinigung eines Debranching-Enzyms sowie die Isolierung einer entsprechenden cDNA beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

Für Mais wurde bisher in der Literatur lediglich die Existenz eines Debranching-Enzyms beschrieben. Dieses wird aufgrund seiner Substratspezifität in die Gruppe der Isoamylasen eingeordnet (siehe z.B. Hannah et al., Scientia Horticulturae 55 (1993), 177-197 oder Garwood (1984) in Starch Chemistry and Technology, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Puschall, E.F. (eds.), Academic Press San Diego, New York, Boston, 25-86). Die entsprechende Mutante wird als sugary bezeichnet. Das Gen des sugary-Locus wurde kürzlich cloniert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429). Neben dem sugary-Locus ist bisher in Mais kein anderer Genlocus bekannt, der ein Protein mit Debranching-Enzymaktivität codiert. Es gab bisher auch keinerlei Hinweise, daß andere Debranching-Enzymformen in Mais vorkommen. Will man transgene

Maispflanzen herstellen, die k innerl i Debranching-Enzymaktivitäten mehr aufweisen, z.B. um ine Verlängerung des Verzweigungsgrades der Amylopektinstärke zu erzielen, so ist es erforderlich, alle in Mais vorkommenden Debranching-Enzymformen zu identifizieren und die entsprechenden Gene oder cDNA-Sequenzen zu isolieren.

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen, vorzugsweise Getreide, insbesondere Weizen, dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen von Verzweigungsenzymen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch modifizierte Pflanzen herzustellen, die die Herstellung von in ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften veränderten pflanzlichen Stärken ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen codiert, vorzugsweise ein Protein, das im wesentlichen durch die unter Seq ID No. 3 oder 7 angegebene Aminosäuresequenz definiert ist. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül, das die unter Seq ID No. 1, 2 oder 6 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon enthält, bevorzugt in Molekül, das die in Seq ID No. 1, 2 d r 6 angeg b n codierende Region enthält sowie hierzu ntsprechende (korrespondierende) Ribonucleotids quenzen. Ganz besonders bevorzugt ist ein Nucleinsäuremolekül, das desweit r n regulatorische Elemente

enthält, die die Transkription sowie gegebenenfalls die Translation der besagten Nucleinsäuremoleküle gewährleistet.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Nucleinsäuremolekül, das mit einem der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hybridisiert.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Nucleinsäuremolekül, das eine Isoamylase aus Weizen codiert und dessen Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

Die Erfindung betrifft auch ein Nucleinsäuremolekül, das eine Sequenz aufweist, die zu der gesamten oder einem Teil einer der obengenannten Sequenzen komplementär ist.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

Besonders bevorzugt erfolgt eine "Hybridisierung" unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer:	2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS
Hybridisierungstemperatur	T = 65 bis 70°C
Waschpuffer:	0,2 x SSC; 0,1% SDS

Waschtemperatur  $T = 40$  bis  $75^{\circ}\text{C}$ .

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell Isoamylasen aus jeder beliebigen Weizenpflanze codieren, die derartige Proteine exprimiert.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Weizen oder Weizenpflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1, 2 oder 6 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die eine erfindungsgemäße Isoamylase aus Weizen codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um eines der

b beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Isoamylasen weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen,

chromatographisches Verhalten, S dimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Ladungseigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Bei dem durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Protein handelt es sich um eine Isoamylase aus Weizen. Diese Proteine weisen gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten Isoamylasen aus anderen Pflanzenarten auf.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein, die z.B. durch Transkription eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls resultieren können. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein oder durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonucleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonucleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Isoamylasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden oder als Hybridisierungsprobe für die Isolierung verwandter Gene. Ebenso können sie Bestandteil von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Mol külen, die für ge ignet Ribozyme codier n.

F rner betrifft die Erfindung Vektoren, insb sondere Plasmide, Cosmide,

Phagemide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten. Derartige Vektoren sind zur Transformation pro- oder eukaryontischer, vorzugsweise pflanzlicher Zellen geeignet.

Besonders bevorzugt erlauben die Vektoren die Integration der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können. Vorzugsweise ist durch die Integration eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in sense- oder anti-sense-Orientierung die Synthese einer translatierbaren oder gegebenenfalls nicht-translatierbaren RNA in den transformierten pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleistet.

Der Begriff "Vektor" bezeichnet im allgemeinen ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Hilfsmittel, das den gezielten Transfer eines ein- oder doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle ermöglicht, beispielsweise einen DNA- oder RNA-Virus, ein Virusfragment, ein Plasmidkonstrukt, das in An- oder Abwesenheit von regulatorischen Elementen zum Nukleinsäure-Transfer in Zellen geeignet sein kann, Trägermaterialien wie Glasfaser oder auch Metallpartikel wie sie z.B. beim "particle gun"-Verfahren eingesetzt werden können, er kann aber auch ein Nukleinsäuremolekül umfassen, das durch chemische oder physikalische Verfahren direkt in eine Zelle gebracht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten oder – sofern gewünscht – die Synthese

einer nicht-translatierbaren RNA gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist für eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, von Bedeutung. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies läßt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

Darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'-Ende der codierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielsweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf

diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_m$ -Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des Weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität des erfindungsgemäßen Proteins aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil des erfindungsgemäßen Proteins aufweisen.

Für die gentechnische Modifikation prokaryontischer Zellen können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse oder weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere pro- oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen

abstammen und ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um pro- oder eukaryontische Zellen, insbesondere um pflanzliche Zellen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinant herstellbare Proteine mit der Aktivität einer Isoamylase, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, worin eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter dem Fachmann bekannten, geeigneten Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des erfindungsgemäßen Proteins erlauben, und es anschließend aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen gezielt einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, den Gel- oder Filmbildungseigenschaften, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu bekannter Stärke verändert ist.

Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Isoamylase zu erhöhen, oder die Einführung in Zellen, die dieses Enzym natürlicherweise nicht exprimieren. Durch die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle besteht auch die Möglichkeit, die natürlicherweise bestehende Aktivität der erfindungsgemäßen Isoamylase in den pflanzlichen Zellen zu erniedrigen. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäße Isoamylasen zu erhalten, die nicht mehr den natürlichen zelleigenen

Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperatur-Aktivitätsprofile oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert werden, worin ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder ein erfindungsgemäßer Vektor in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert wird, die transgenen Pflanzenzellen, die mittels eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls oder Vektors transformiert wurden sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Die erfindungsgemäßen Zellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren, wobei diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem geeigneten Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß in solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h.

in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist/sind an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt (vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auf, die sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach nachweisen lassen.

Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise mehr Transkripte der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr, b vorzugt mindestens 20% mehr und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr Transkripte als entsprechende, nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen fern r ine entsprechende (mindestens 10%, 20 % bzw. 50%ige) Aktivitätst ig rung oder ggf. ine Aktivitätsreduzierung des

erfindungsgemäßen Proteins auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Ebenfalls ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, worin ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert werden und eine vollständige Pflanze aus besagter Pflanzenzelle regeneriert wird. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, vorzugsweise stärke-synthetisierende bzw. stärke-speichernde Pflanzen, besonders bevorzugt Roggen, Gerste Hafer, Weizen, Hirse, Sago, Mais, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse oder Arrowroot, insbesondere Weizen, Mais, Reis und Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Calli, Protoplasten, Zellkulturen etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze.

Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärke-speichernden Teilen von Pflanzen, insbesondere aus Weizen, sind dem Fachmann bekannt, vgl. z.B. Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe ,

Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Film- oder Gelbildungseigenschaften von Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu bekannten Stärken verändert sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial erhältlich ist und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanz n zu erzeug n, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthes einer Stärke mit verändert n chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften

verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein transgene Pflanzenzelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, in der die Aktivität einer Isoamylase im Vergleich zu einer nichttransformierten Zellen reduziert ist.

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität einer Isoamylase kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eine Isoamylase codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Verfahren, vgl. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr.-Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität einer erfindungsgemäßen Isoamylase in den pflanzlichen Zellen die Anzahl der sie codierenden Transkripte reduziert, z.B. durch Expression einer antisense-RNA.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere

Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Zelle oder Pflanze und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Zellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial oder deren Teilen erhältlich ist sowie Stärke, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärken in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein.

Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch z.B. geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäßen Stärken wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

#### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Viskositätsstabilität in Salzlösungen, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

#### 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedlich Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt werden. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen.

Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

## 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

## 2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoff auf Stärkebasis werden in den Bereichen

Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten,

Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

### 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

### 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

## 2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

## 2.6 Einsatz in Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt in der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

## 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird.

Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbe reich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

## 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

## 2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

## 2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittelversetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

## 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs

und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

#### 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

#### 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Desweiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Viskositätsstabilität in Salzlösungen, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitzebehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, Oxidation und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Desweiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether), S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Pfropf-Polymerisate resultieren.

Eine bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäße Stärken liegt in der Herstellung von Verpackungsmaterial und Einwegartikeln einesits sowie als

Lebensmittel oder Lebensmitt Ivorprodukt ander rseits.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren, Enhancer und Terminatoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatin-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Element sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die in

Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen codieren. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle erlauben die Herstellung dieses Enzyms, dessen funktionale Identifizierung innerhalb der Stärkebiosynthese, die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist und ermöglicht somit die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in derartig modifizierten Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, in denen die Aktivität der erfindungsgemäßen Isoamylase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer Isoamylase in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Ferner können Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Stärkesynthasen oder von Verzweigungsenzymen inhibiert ist (wie z.B. in WO 92/14827 oder Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden bzw. unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Für

die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in ein m derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es prinzipiell nicht. Das entstehende Transkript sollte aber vorzugsweise eine Länge von 10 kb und insbesondere eine Länge von 5 kb nicht überschreiten.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärke Korn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (Isoamylasen, Pullulanasen, R-Enzyme, "Branching"-Enzyme, "Debranching"-Enzyme), Stärkephosphorylasen und Disproportionierungs-enzyme. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in pflanzliche Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärke Korn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärk phosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus

derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium läßt sich zur Transformation von Pflanzenzellen verwenden.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist

intensiv untersucht und ausrichtend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches u.a. bestimmte Zucker, Aminosäuren, Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Verfahren zur Transformation von monokotylen Pflanzen bestehen mittels des biolistischen Ansatzes, der Protoplastentransformation oder der physikalisch oder chemisch induzierten DNA-Aufnahme in Protoplasten, z.B. durch Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, Transfer von DNA mittels Glasfasern, Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion

von DNA in Mikrosporen oder Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269 – 273).

Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne et al., *Euphytica* 85 (1995), 35 – 44).

Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 bis 178): Hess et al. (*Plant Sci.* 72 (1990), 233) benutzten das Verfahren der Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien in unmittelbare Nähe zu bringen. Die Mobilisierung des Plasmids, das das nptII Gen als selektierbaren Marker enthielt, wurde mittels Southern Blot Analyse und NPTII Test nachgewiesen. Die Transformanten zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Die Kanamycin-Resistenz konnte in zwei aufeinanderfolgende Generationen nachgewiesen werden.

Die erste transgene, fertile Weizenpflanze, die nach Beschuß mit Mikroprojektil-gebundener DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (*Bio/Technology* 10 (1992), 667 – 674) beschrieben. Das Zielgewebe für den Beschuß war eine embryogene Kalluskultur (Typ C Kallus). Als Selektionsmarker wurde das bar Gen eingesetzt, das eine Phosphinothricin Acetyltransferase codiert und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin vermittelt. Ein weiteres System wurde von Weeks et al. (*Plant Physiol.* 102 (1993), 1077 – 1084), sowie Becker et al. (*Plant J.* 5(2) (1994), 299 – 307) beschrieben. Hier ist das Zielgewebe für die DNA-Transformation das Skutellum unrunder Embryonen, das in einer einleitenden in vitro Phase zur Induktion somatischer

Embryonen angeregt wurde. Die Effizienz der Transformation liegt bei dem von Becker et al. (loc. cit.) entwickelten System mit 1 transgene Pflanze pro 83 Embryonen der Sorte "Florida" deutlich höher als bei dem von Weeks et al. etablierten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Sorte "Bohwhite".

Das von Becker et al. (loc. Cit) entwickelte System bildet die Basis für die in den Beispielen beschriebenen Transformationsexperimente.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen der oben erwähnten Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen z.B. Resistenz gegenüber einem Biozid wie Phosphinothricin oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder Hygromycin vermittelt oder die Selektion über die An- oder Abwesenheit bestimmter Zucker oder Aminosäuren gestattet. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen gestatten, denen die eingeführte DNA fehlt.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenschaften erhalten geblieben sind.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrieren und stellen keinerlei Beschränkung dar.

### 1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

### 2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die antisense-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die *in vivo* Excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

### 3. Transformation unreifer Weizenembryonen

#### Medien

MS:	100 ml/l Makrosalz	(D.Becker und H. Lörz,
	1 ml/l Mikrosalz	Plant Tissue Culture
	2 ml/l Fe/NaEDTA	Manual (1996), B 12:1-20)
	30 g/l Saccharose	

#30: MS + 2,4-D (2 mg/l)

#31: MS + 2,4-D (2 mg/l) + Phosphinothricin (PPT, aktiv  
Komponente des Herbizids BASTA (2 mg/l))

#32: MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)

#39: MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit

Die angegebenen Medien wurden auf den pH-Wert 5,6 mit KOH eingestellt und mit 0,3 % Gelrite verfestigt.

Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und Lörz (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde sich an das von Becker und Lörz (loc. Cit) ausgearbeitete Protokoll gehalten.

Zur Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14 Tage nach Anthesis geerntet und oberflächensterilisiert. Die isolierten Skutella werden mit der dem Medium zugewandten Embryoachse auf Induktionsmedium # 30 plattiert.

Nach 2 bis 4 tägiger Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.

Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und inem Resistenzmarkergen (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.

#### 4. DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland).

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

20 x SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g Natrium-Citrat
	ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O
	pH 7,0 mit 10 N NaOH

Bei der DSMZ in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, erfolgte die Hinterlegung des Plasmids pTaSU 8A gemäß Budapester Vertrag unter der Nr. DSM 12795 sowie des Plasmids pTaSU 19 unter der Nr. DSM 12796.

Beispiel 1: Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (*Triticum aestivum* L., cv Florida) codiert

Zur Identifizierung einer cDNA, die eine Isoform einer Isoamylase (sugary) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des heterologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit einer sugary-Sonde aus Mais durchmustert.

Die Isolierung der Sonde (sugary-Sonde) aus einer Mais cDNA Bank erfolgte mittels spezifischer Primer durch PCR-Amplifikation. Die Clonierung der Mais cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA aus einem Gemisch gleicher Anteile 13,17,19,20,22,25 und 28 Tage (DAP) alter Karyopsen in einem Lambda Zap II Vektor analog den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit

Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Bei allen v erw end ten Karyopsen, au ßer bei den 13 Tag alten Körn rn, war vor der RNA-Isolierung der Embryo entfernt worden.

Die Amplifizierung des DNA-Fragmentes, das als Sonde zur Durchmusterung der Weizen cDNA Bank eingesetzt wurde, erfolgte mit den folgenden Primern:

su1p-1a: 5 'AAAGGCCCAATATTATCCTTTAGG 3 '(Seq.ID No. 4)

su1p-2: 5 'GCCATTTCAACCGTTCTGAAGTCGGGAAGTC 3 '(Seq.ID No. 5)

Als Template für die PCR-Reaktion wurden 2 µl der amplifizierten Mais cDNA Bank eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt des weiteren 1,5-3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0.8mM dNTP Mix, 1µM Primer su1p-1a, 1µM Primer su1p-2 und 2.5 Units Taq Polymerase (rekombinant, Life Technologies). Die Amplifizierung wurde mit einem Trioblock der Firma Biometra nach dem Schema: 4 '(min)/ 95°C; 1 ' / 95°C; 45 ' '(sek)/ 58°C; 1 ' 15 ' ' / 72°C; 30 Cyclen 5 ' / 72°C. Die amplifizierte DNA Bande von ca. 990 bp wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Von diesem Fragment wurde nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben eine zweite Amplifizierung durchgeführt. Das aus dieser zweiten Amplifizierung erhaltene 990 bp Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *BAM* HI in ein 220 bp und ein 770 bp Fragment zerschnitten. Nach nochmaliger Auftrennung des sugary-Fragmentes in einem Agarosegel, Ausschneiden der Bande und Isolierung des Fragmentes erfolgte die DIG-Markierung der Sonde. Zur 'random prime' Markierung mit Digoxigenin wurden 500 ng sugary Fragment eingesetzt. Zu dem zu markierenden Fragment wurden 10 µl Random Primer gegeben und die Reaktion wurde 5 ' bei 95-100°C erhitzt. Nach dem Erwärmen wurden 0,1mM dATP, 0,1mM dGTP, 0,1mM dCTP und 0,065mM dTTP und 0,035 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), sowie Klenow Puff r (Standard) und 1 Unit Klenow Polymerase zug g ben. Die Reaktion wurde bei RT (Raumtemperatur) über Nacht durchgeführt. Zur Kontrolle der Markierung wurd ein Dot-T st analog den Angaben des H rstellers ( 'The DIG System Us r 's Guide for Filter

Hybridization (d r Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Synthese der Weizen cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA von ca. 21 Tage (starchy-Endosperm) alten Karyopsen in einen Lambda Zap II Vektor entsprechend den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg). Nach Titerbestimmung der cDNA-Bank konnte ein Primärtiter von  $1,26 \times 10^6$  pfu/ml ermittelt werden.

Zum Durchmustern der Weizen cDNA Bank wurden ca. 350.000 Phagen ausplattiert. Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter wurde in 5X SSC, 3% Blocking (Boehringer, Mannheim), 0,2% SDS, 0,1% Natrium Laurylsarcosin und 50 µg/ml Heringssperma DNA bei 55°C durchgeführt. Der Hybridisierungslösung wurde 1ng/ml der markierten sugary Sonde zugesetzt und die Hybridisierung über Nacht inkubiert. Gewaschen wurden die Filter für 2X5' in 2X SSC, 1% SDS bei RT; 2X 10' in 1X SSC, 0,5% SDS bei 55°C; 2x 10' in 0,5X SSC, 0,2% SDS bei 55°C. Positive Clone wurden durch weitere Screening Runden vereinzelt. Über *in vivo* Excision wurden vereinzelte Clone als pBluescript SK Phagemide erhalten (Durchführung analog den Angaben des Herstellers; Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

Nach Analyse der Clone über Minipräparierung und Restrangierung der Plasmid-DNA wurde der Clon pTaSU -19 bei der DSMZ-Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 12796 hinterlegt und weiter analysiert.

**Beispiel 2:** Sequenzanalyse der cDNA-Insertionen des Plasmids pTaSU19

Aus dem Clon pTaSU19 wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertionen mittels der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt.

Die Insertion des Clons TaSU-19 ist 2997 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben.

Eine Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz eine codierende Region umfaßt, die Homologien zu Isoamylasen aus anderen Organismen aufweist.

Die Analyse der Sequenz zeigt auch, daß sich in der cDNA Sequenz zwei Introns in den Positionen 297-396 (Intron 1) und 1618-2144 (Intron 2) befinden.

Werden diese Introns entfernt, läßt sich eine Proteinsequenz ableiten, die Homolgien zu den Proteinsequenzen von Isoamylasen anderer Organismen aufweist. Die zu den codierenden Bereichen der Seq ID No. 1 korrespondierende Aminosäure-Sequenz ist unter Seq ID No. 3 dargestellt.

### Beispiel 3 Herstellung des Pflanzentransformationsvektors pTa-alpha-SU19

Für die Expression einer zur TaSU19-cDNA korrespondierenden antisense-RNA wurden auf der Grundlage des Basisplasmids pUC19 der Pflanzentransformationsvektoren pTa-alpha-SU19 konstruiert, indem die cDNA-Insertion des Plasmids pTa-alpha-SU19 in antisense-Orientierung mit dem 3' Ende des Ubiquitin-Promotors verbunden wurden. Dieser Promotor besteht aus dem ersten untranslatierten Exon und dem ersten Intron des *ubiquitin 1* Gens aus Mais (Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675-689). Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator stammen aus dem Plasmid pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukten, die auf pAct1.cas basieren, sind in MCElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27-37) beschrieben. Der so entstandene Vektor wurde pUbi.cas genannt.

Die Klonierung des Vektors erfolgt durch Restriktion ein s 2kb Fragmentes aus dem Klon Ta-SU19 mit dem Restriktionsenzym *Xba I*. Das Fragment wurde an

den Enden mittels einer Klenow R aktion aufgefüllt und anschließend in die *Sma* / Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUbi.cas ligiert.

Der entstandene Expressionsvektor wird als Ta-alpha-SU 19 bezeichnet und wird wie oben beschrieben zur Transformation von Weizen verwendet.

**Beispiel 4: Isolierung und Charakterisierung einer weiteren cDNA, die für eine Isoamylase (Sugary1-homolog) aus Weizen (*Triticum aestivum* L., cv Florida) kodiert**

Eine cDNA-Bank aus Weizen wurde mit einer Sugary-Sonde durchmustert, die einen Teil des Klons pTaSU19, und zwar Position 489-1041 aus Seq.ID No. 1, repräsentiert.

Die Herstellung der weizenspezifischen Digoxigenin-markierten Sugary-Sonde, die zur Durchmusterung der cDNA-Bank eingesetzt wurde, erfolgte mittels PCR-Amplifizierung. Die in dieser Reaktion eingesetzten Primer waren:

SUSO1: 5'-GCT TTA CGG GTA CAG GTT CG-3' (Seq.ID No.8), und  
SUSO2: 5'-AAT TCC CCG TTT GTG AGC-3' (Seq.ID No.9)

Als Template wurde 1 ng des Plasmids pTaSU19 in die Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt außerdem je 300 nM der Primer SUSO1 und SUSO2, je 100 µM der Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, 65 µM dTTP, 35 µM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 2,5 U (Units) Taq Polymerase und 10 µl 10-fach konzentrierten Taq Polymerase Reaktionspuffer (beides Life Technologies). Das Endvolumen der Reaktion betrug 100 µl.

Die Amplifizierung erfolgte auf einem PCR-G rät (TRIO Thermoblock, Biometra) unter folgendem Temperaturprogramm: 3' (min) b i 95°C (1-mal); 45" (sek) bei 95°C - 45" b i 55 C - 2' bei 72°C (30 Zyklen); 5' bei 72 C (1-mal).

Es resultierte ein DNA-Fragment von 553 bp Länge. Der Einbau von

Digoxigenin-11-dUTP in das PCR-Produkt zeigte sich anhand der geringeren Mobilität im Agarosegel im Vergleich zu dem Produkt einer Kontrollreaktion ohne Digoxigenin-11-dUTP.

Die Karyopsen-spezifische cDNA-Bank aus Weizen aus Beispiel 1 wurde mit der erhaltenen Digoxigenin-markierten Sonde durchmustert.

Der Hybridisierungsschritt erfolgte über Nacht in 5x SSC, 0.2% SDS, 0.1% N-Laurylsarcosin und 50 µg/ml Heringssperma DNA bei 68°C in Gegenwart von 1 ng/ml der Digoxigenin-markierten Sonde. Nach der Hybridisierung wurden die Filter in folgender Weise gewaschen: 2x5' in 2x SSC, 1% SDS bei RT; 2x10' in 1x SSC, 0.5% SDS bei 68°C; 2x 10' in 0,5x SSC, 0,2% SDS bei 68°C.

Positive Klone wurden durch mindestens zwei weitere Screening-Runden vereinzelt. Über *in vivo* Excision wurden aus den Phagenklonen pBluescript SK Plasmide erhalten (Protokolle nach Angaben des Herstellers; Stratagene, Heidelberg, Deutschland). Nach Restriktionsanalyse der erhaltenen Klone wurde der Klon pTaSU8A bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen unter der Nummer DSM 12795 hinterlegt und weiter untersucht.

#### Beispiel 5: Sequenzanalyse des cDNA-Inserts im Plasmid pTaSU8A

Die Nukleotidsequenz des cDNA-Inserts im Plasmid pTaSU8A wurde mittels der Didesoxynukleotidmethode bestimmt (Seq.ID No.6).

Die Insertion des Klons pTaSU8A ist 2437 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Ein Vergleich zu bereits publizierten Sequenzen zeigt, daß die unter Seq.ID No.6 dargestellte Sequenz eine codierende Region umfaßt, die Homologien zu Isoamylasen aus weiteren Organismen aufweist. Gleichfalls zeigt die vom kodierenden Bereich des Klons pTaSU8A abgeleitete Proteinsequenz, dargestellt in Seq.ID No. 7, Homologien zu den Proteinsequenzen von Isoamylasen anderer Organismen. Vergleicht man die Sequenzen der Klone pTaSU19 (Seq.ID No. 1)

und pTaSU8A (Seq.ID No. 6), so ergibt sich eine Ähnlichkeit von 96,8%. Die meisten Sequenzunterschiede liegen im 3'-untranslatierten Bereich der cDNAs. Die übrigen Sequenzunterschiede im kodierenden Bereich bedingen verschiedene Aminosäuren an insgesamt zwölf Positionen der abgeleiteten Proteinsequenzen (Seq.ID No. 3 und 7). Die in pTaSU19 und pTaSU8A enthaltenen cDNAs sind nicht identisch und kodieren für Isoformen der Isoamylase aus Weizen.

#### Beispiel 6: Herstellung des Pflanzentransformationsvektors pTa-alpha-SU8A

Für die Expression einer zur TaSU8A-cDNA korrespondierenden antisense-RNA wurde auf der Grundlage des Basisplasmids pUC19 der Pflanzentransformationsvektor pTa-alpha-SU8A-konstruiert, indem ein durch PCR-Amplifizierung hergestellter Teil der TaSU8A-cDNA in antisense-Orientierung mit dem 3'-Ende des Ubiquitin-Promotors verbunden wurde. Dieser Promotor besteht aus dem ersten untranslatierten Exon und dem ersten Intron des *ubiquitin* / Gens aus Mais (Christensen A.H. et al., Plant Mol.Biol. 18 (1992), 675-689). Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator stammen aus dem Plasmid pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator sowie Konstrukte, die auf pAct1.cas basieren, sind von McElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27-37) beschrieben worden. Der Vektor mit Ubiquitin-Promotor, Polylinker und NOS-Terminator auf der Basis von pUC19 wurde pUbi.cas bezeichnet.

Für die Klonierung von pTa-alpha-SU8A wurde ein ca. 2,2 kb großer Teil der TaSU8A-cDNA, und zwar Position 140-2304 aus Seq.ID No.6, mittels PCR amplifiziert.

Die in dieser Reaktion eingesetzten Primer waren:

SUEX3: 5'-GCG GTA CCT CTA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCG GAG GAC  
AGG TAC GCG CTC-3' (Seq.ID No. 10), und

SUEX4: 5'-GCT CGA GTC GAC TCA AAC ATC AGG GCG CAA TAG-3' (S q.ID No. 11):

Als Template wurde 1 ng des Plasmids pTaSU8A in die Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt außerdem: Je 300 nM der Primer SUEX3 und SUEX4, je 200  $\mu$ M der Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 1,6 mM  $MgCl_2$ , 60 mM Tris- $SO_4$  (pH 9,1) 18 mM  $(NH_4)_2SO_4$  sowie 1  $\mu$ l Elongase<sup>®</sup> Enzym Mix (Taq Polymerase und DNA Polymerase Gemisch, Life Technologies). Das Endvolumen der Reaktion betrug 50  $\mu$ l. Die Amplifizierung erfolgte auf einem PCR-Gerät (TRIO<sup>®</sup> Thermoblock, Biometra) unter folgendem Temperaturprogramm: 1' (min) bei 94°C (1-mal); 30" (sek) bei 95°C - 30" bei 55°C - 2'30" bei 68°C (30 Zyklen); 10' bei 68°C (1-mal). In der Reaktion entstand ein DNA-Fragment von 2205 bp Länge.

Das 2,2 kb-Produkt wurde mit *KpnI* und *SaI* restringiert und in den mit *KpnI* und *SaI* vorgeschnittenen Expressionsvektor pUbi.cas ligiert. Der so entstandene Pflanzentransformationsvektor wurde pTa-alpha-SU8A genannt und wie oben beschrieben zur Transformation von Weizen verwendet.

**Patentansprüche:**

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - (a) einem Nucleinsäuremolekül, das ein Protein codiert, das eine unter Seq ID NO. 3 oder Seq ID NO. 7 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt,
  - (b) einem Nucleinsäuremolekül, das die unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 6 dargestellte Nucleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt oder eine hierzu korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
  - (c) einem Nucleinsäuremolekül, das mit einem der unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremoleküle hybridisiert oder komplementär dazu ist, und
  - (d) einem Nucleinsäuremolekül, dessen Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz eines unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküls abweicht.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein DNA-Molekül ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es ein cDNA-Molekül ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, das regulatorische Elemente enthält.
5. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein RNA-Molekül ist.

6. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5 hybridisiert.
7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotiden ist.
8. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
9. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.
10. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Synthese einer nicht-translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.
11. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in antisense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Synthese einer nicht-translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.
12. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11 transformiert ist oder die von einer solchen Zelle abstammt.
13. Protein, codiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.

14. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 13, worin eine Wirtszelle nach Anspruch 12 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des besagten Proteins erlauben und besagtes Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
15. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, worin
  - a) ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder
  - b) ein Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11 in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert wird.
16. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder einem Vektor nach einem oder mehreren Anspruch 8 bis 11 transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle abstammt.
17. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, worin
  - a1) ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder
  - a2) ein Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11 in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert wird und
  - b) eine vollständige Pflanze aus besagter Pflanzenzelle regeneriert wird.
18. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 16.
19. Pflanze nach Anspruch 19, die eine monokotyle oder dikotyle Pflanze ist.
20. Pflanze nach Anspruch 19, die eine Nutzpflanze ist.
21. Pflanze nach Anspruch 20, die eine stärke-speichernde Pflanze ist.

22. Pflanze nach Anspruch 21, die eine Mais, Reis, Kartoffel oder Weizenpflanze ist.
23. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22.
24. Stärke, erhältlich aus einer Pflanzenzelle gemäß Anspruch 16, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22 oder aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 23.
25. Verwendung der Stärke nach Anspruch 24 zur Herstellung von Lebensmitteln oder Lebensmittelvorprodukten, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.
26. Verwendung der Stärke nach Anspruch 24 zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Hoechst Schering AgrEvo GmbH  
 <120> Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der  
 Stärkesynthase beteiligt sind  
 <150> DE 198 20 608.9  
 <151> 1998-05-08  
 <160> 11  
  
 <210> 1  
 <211> 2997  
 <212> DNA  
 <213> Triticum aestivum L. cv. Florida  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3) ... (296); (397) ... (1617); (2145) ... (2960)

GG TCG GGG CCG GCG CCG CGC CTG CGA CGG TGG CGA CCC AAT GCG ACG	47
Ser Gly Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala Thr	
1 5 10 15	
GCG GGG AAG GGG GTC GGC GAG GTG TGC GCC GCG GTT GTC GAG GCG GCG	95
Ala Gly Lys Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Ala Ala	
20 25 30	
ACG AAG GTA GAG GAC GAG GGG GAG GAG GAC GAG CCG GTG GCG GAG GAC	143
Thr Lys Val Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu Asp	
35 40 45	
AGG TAC GCG CTC GGC GGC GCG TGC AGG GTG CTC GCC GGA ATG CCC GCG	191
Arg Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Ala	
50 55 60	
CCG CTG GGC GCC ACC GCG CTC GCC GGC GGG GTC AAT TTC GCC GTC TAT	239
Pro Leu Gly Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val Tyr	
65 70 75	
TCC GGC GGA GCC ACC GCC GCG GCG CTC TGC CTC TTC ACG CCA GAA GAT	287
Ser Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu Asp	
80 85 90 95	
CTC AAG GCG GTGGGGTTGC CTCCCGAGTA GAGTTCATCA GCTTTGCGTG	336
Leu Lys Ala	
CGCCGCGCGC CCCTTTTTTG GGCCTGCAAT TTAAGTTTTG TACTGGGGCA AATGCTGCAG	396
GAT AGG GTG ACC GAG GAG GTT CCC CTT GAC CCC CTG ATG AAT CGG ACC	444
Asp Arg Val Thr Glu Glu Val Pro Leu Asp Pro Leu Met Asn Arg Thr	
1 5 10 15	
GGG AAC GTG TGG CAT GTC TTC ATC GAA GGC GAG CTG CAC AAC ATG CTT	492
Gly Asn Val Trp His Val Phe Ile Glu Gly Glu Leu His Asn Met Leu	
20 25 30	
TAC GGG TAC AGG TTC GAC GGC ACC TTT GCT CCT CAC TGC GGG CAC TAC	540
Tyr Gly Tyr Arg Phe Asp Gly Thr Phe Ala Pro His Cys Gly His Tyr	

35					40					45						
CTT	GAT	GTT	TCC	AAT	GTC	GTG	GTG	GAT	CCT	TAT	GCT	AAG	GCA	GTG	ATA	588
Leu	Asp	Val	Ser	Asn	Val	Val	Val	Asp	Pro	Tyr	Ala	Lys	Ala	Val	Ile	
	50					55					60					
AGC	CGA	GGG	GAG	TAT	GGT	GTT	CCA	GCG	CGT	GGT	AAC	AAT	TGC	TGG	CCT	636
Ser	Arg	Gly	Glu	Tyr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Gly	Asn	Asn	Cys	Trp	Pro	
	65				70					75					80	
CAG	ATG	GCT	GGC	ATG	ATC	CCT	CTT	CCA	TAT	AGC	ACG	TTT	GAT	TGG	GAA	684
Gln	Met	Ala	Gly	Met	Ile	Pro	Leu	Pro	Tyr	Ser	Thr	Phe	Asp	Trp	Glu	
				85					90					95		
GGC	GAC	CTA	CCT	CTA	AGA	TAT	CCT	CAA	AAG	GAC	CTG	GTA	ATA	TAT	GAG	732
Gly	Asp	Leu	Pro	Leu	Arg	Tyr	Pro	Gln	Lys	Asp	Leu	Val	Ile	Tyr	Glu	
		100					105					110				
ATG	CAC	TTG	CGT	GGA	TTC	ACG	AAG	CAT	GAT	TCA	AGC	AAT	GTA	GAA	CAT	780
Met	His	Leu	Arg	Gly	Phe	Thr	Lys	His	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Glu	His	
	115						120					125				
CCG	GGT	ACT	TTC	ATT	GGA	GCT	GTG	TCG	AAG	CTT	GAC	TAT	TTG	AAG	GAG	828
Pro	Gly	Thr	Phe	Ile	Gly	Ala	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys	Glu	
	130					135					140					
CTT	GGA	GTT	AAT	TGT	ATT	GAA	TTA	ATG	CCC	TGC	CAT	GAG	TTC	AAC	GAG	876
Leu	Gly	Val	Asn	Cys	Ile	Glu	Leu	Met	Pro	Cys	His	Glu	Phe	Asn	Glu	
	145				150					155					160	
CTG	GAG	TAC	TCA	ACC	TCT	TCT	TCC	AAG	ATG	AAC	TTT	TGG	GGA	TAT	TCT	924
Leu	Glu	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Lys	Met	Asn	Phe	Trp	Gly	Tyr	Ser	
				165					170					175		
ACC	ATA	AAC	TTC	TTT	TCA	CCA	ATG	ACA	AGA	TAC	ACA	TCA	GGC	GGG	ATA	972
Thr	Ile	Asn	Phe	Phe	Ser	Pro	Met	Thr	Arg	Tyr	Thr	Ser	Gly	Gly	Ile	
			180					185					190			
AAA	AAC	TGT	GGG	CGT	GAT	GCC	ATA	AAT	GAG	TTC	AAA	ACT	TTT	GTA	AGA	1020
Lys	Asn	Cys	Gly	Arg	Asp	Ala	Ile	Asn	Glu	Phe	Lys	Thr	Phe	Val	Arg	
	195					200					205					
GAG	GCT	CAC	AAA	CGG	GGA	ATT	GAG	GTG	ATC	CTG	GAT	GTT	GTC	TTC	AAC	1068
Glu	Ala	His	Lys	Arg	Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Val	Val	Phe	Asn	
	210					215					220					
CAT	ACA	GCT	GAG	GGT	AAT	GAG	AAT	GGT	CCA	ATA	TTA	TCA	TTT	AAG	GGG	1116
His	Thr	Ala	Glu	Gly	Asn	Glu	Asn	Gly	Pro	Ile	Leu	Ser	Phe	Lys	Gly	
	225				230					235					240	
GTC	GAT	AAT	ACT	ACA	TAC	TAT	ATG	CTT	GCA	CCC	AAG	GGA	GAG	TTT	TAT	1164
Val	Asp	Asn	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Met	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Glu	Phe	Tyr	

245						250						255							
AAC	TAT	TCT	GGC	TGT	GGG	AAT	ACC	TTC	AAC	TGT	AAT	CAT	CCT	GTG	GTT	1212			
Asn	Tyr	Ser	Gly	Cys	Gly	Asn	Thr	Phe	Asn	Cys	Asn	His	Pro	Val	Val				
260						265						270							
CGT	CAA	TTC	ATT	GTA	GAT	TGT	TTA	AGA	TAC	TGG	GTG	ACG	GAA	ATG	CAT	1260			
Arg	Gln	Phe	Ile	Val	Asp	Cys	Leu	Arg	Tyr	Trp	Val	Thr	Glu	Met	His				
275						280						285							
GTT	GAT	GGT	TTT	CGT	TTT	GAT	CTT	GCA	TCC	ATA	ATG	ACC	AGA	GGT	TCC	1308			
Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	Ala	Ser	Ile	Met	Thr	Arg	Gly	Ser				
290						295						300							
AGT	CTG	TGG	GAT	CCA	GTT	AAC	GTG	TAT	GGA	GCT	CCA	ATA	GAA	GGT	GAC	1356			
Ser	Leu	Trp	Asp	Pro	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Gly	Asp				
305						310						315						320	
ATG	ATC	ACA	ACA	GGG	ACA	CCT	CTT	GTT	ACT	CCA	CCA	CTT	ATT	GAC	ATG	1404			
Met	Ile	Thr	Thr	Gly	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Pro	Pro	Leu	Ile	Asp	Met				
325						330						335							
ATC	AGC	AAT	GAC	CCA	ATT	CTT	GGA	GGC	GTC	AAG	CTC	ATT	GCT	GAA	GCA	1452			
Ile	Ser	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Gly	Gly	Val	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala				
340						345						350							
TGG	GAT	GCA	GGA	GGC	CTC	TAT	CAA	GTA	GGT	CAA	TTC	CCT	CAC	TGG	AAT	1500			
Trp	Asp	Ala	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Gly	Gln	Phe	Pro	His	Trp	Asn				
355						360						365							
GTT	TGG	TCT	GAG	TGG	AAT	GGG	AAG	TAC	CGG	GAC	ATT	GTG	CGT	CAA	TTC	1548			
Val	Trp	Ser	Glu	Trp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ile	Val	Arg	Gln	Phe				
370						375						380							
ATT	AAA	GGC	ACT	GAT	GGA	TTT	GCT	GGT	GGT	TTT	GCC	GAA	TGT	CTT	TGT	1596			
Ile	Lys	Gly	Thr	Asp	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Phe	Ala	Glu	Cys	Leu	Cys				
385						390						395						400	
GGA	AGT	CCA	CAC	CTA	TAC	CAG	GTAAGTTGTG				GCAATACTTG				TAAATGAGTT		1647		
Gly	Ser	Pro	His	Leu	Tyr	Gln													
405																			
GAGTGAATGT CACCTGGATT TTTTATATAT ACCACATGAT GATACACATC TAAATATATA																1707			
ACAATCATAG TGTATGCATA TGCATTTGGC TAAGAAGTAT TAGTGTATAC ACTAGTGCTA																1767			
TATATAGGTT TTAACACCCA ACTTGCCAAT GAAGGAACAT AGGGCTTTCT AGTTATCTTA																1827			
TTTATTTGTC CGGTGAATAA TCCACTGAAA AATTCCAGCC ATGTCATTTT TTAGGGGGGG																1887			
AGAAGAAACT ATATTGATTT GCCCCCTAA AAGAAGCCAT CTCAGAATTC ATAGGTAAGT																1947			
TGCTTTTCTG TAAAGAAAGG AAAACGACTT CATACTTTCT ATCGGTGCTA ACTTAGCTCG																2007			
ATGTATATTT GTAAGATGAA TGCCAAATTT AATTTGTCGG ATAATTTGAT CTGTTATTCA																2067			

CAAATTTCTA TTTGGTTTCT CTAGAAATCA AACCAGTAAC TTGTTATTGG CACTGCAACT	2127
TCTTATTGAT TAATCAG GCA GGA GGA AGG AAA CCT TGG CAC AGT ATC AAC	2177
Ala Gly Gly Arg Lys Pro Trp His Ser Ile Asn	
1 5 10	
TTT GTA TGT GCA CAT GAT GGA TTT ACA CTG GCT GAT TTG GTA ACA TAT	2225
Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu Val Thr Tyr	
15 20 25	
AAT AAG AAG TAC AAT TTA CCA AAT GGG GAG AAC AAC AGA GAT GGA GAA	2273
Asn Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu Asn Asn Arg Asp Gly Glu	
30 35 40	
AAT CAC AAT CTT AGC TGG AAT TGT GGG GAG GAA GGA GAA TTC GCA AGA	2321
Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly Glu Phe Ala Arg	
45 50 55	
TTG TCT GTC AAA AGA TTG AGG AAG AGG CAG ATG CGC AAT TTC TTT GTT	2369
Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn Phe Phe Val	
60 65 70 75	
TGT CTC ATG GTT TCT CAA GGA GTT CCA ATG TTC TAC ATG GGT GAT GAA	2417
Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Phe Tyr Met Gly Asp Glu	
80 85 90	
TAT GGC CAC ACA AAA GGG GGC AAC AAC AAT ACA TAC TGC CAT GAT TCT	2465
Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys His Asp Ser	
95 100 105	
TAT GTC AAT TAT TTT CGC TGG GAT AAA AAA GAA CAA TAC TCT GAG TTG	2513
Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Glu Gln Tyr Ser Glu Leu	
110 115 120	
CAC CGA TTC TGC TGC CTC ATG ACC AAA TTC CGC AAG GAG TGC GAG GGT	2561
His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe Arg Lys Glu Cys Glu Gly	
125 130 135	
CTT GGC CTT GAG GAC TTT CCA ACG GCC AAA CGG CTG CAG TGG CAT GGT	2609
Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Lys Arg Leu Gln Trp His Gly	
140 145 150 155	
CAT CAG CCT GGG AAG CCT GAT TGG TCT GAG AAT AGC CGA TTC GTT GCC	2657
His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu Asn Ser Arg Phe Val Ala	
160 165 170	
TTT TCC ATG AAA GAT GAA AGA CAG GGC GAG ATC TAT GTG GCC TTC AAC	2705
Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile Tyr Val Ala Phe Asn	
175 180 185	
ACC AGC CAC TTA CCG GCC GTT GTT GAG CTC CCA GAG CGC GCA GGG CGC	2753
Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu Pro Glu Arg Ala Gly Arg	

190	195	200	
CGG TGG GAA CCG GTG GTG GAC ACA GGC AAG CCA GCA CCA TAC GAC TTC			2801
Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala Pro Tyr Asp Phe			
205	210	215	
CTC ACC GAC GAC TTA CCT GAT CGC GCT CTC ACC ATA CAC CAG TTC TCG			2849
Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu Thr Ile His Gln Phe Ser			
220	225	230	235
CAT TTC CTC TAC TCC AAC CTC TAC CCC ATG CTC AGC TAC TCA TCG GTC			2897
His Phe Leu Tyr Ser Asn Leu Tyr Pro Met Leu Ser Tyr Ser Ser Val			
	240	245	250
ATC CTA GTA TTG CGC CCT GAT GTT TGA GAG ACC AAT ATA TAC AGT AAA			2945
Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val * Glu Thr Asn Ile Tyr Ser Lys			
	255	260	265
TAA TAT GTC TAT ATG TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA			2997
* Tyr Val Tyr Met			
270			

<210>	2
<211>	2295
<212>	DNA
<213>	Triticum aestivum L. cv. Florida
<220>	
<223>	cDNA
<400>	2

GGTCGGGGCC GGCGCCGCGC CTGCGACGGT GGCGACCCAA TGCGACGGCG GGAAGGGGG	60
TCGGCGAGGT GTGCGCCGCG GTTGTGAGG CGGCGACGAA GGTAGAGGAC GAGGGGGAGG	120
AGGACGAGCC GGTGGCGGAG GACAGGTACG CGCTCGGCGG CGCGTGCAGG GTGCTCGCCC	180
GAATGCCCGC GCCGCTGGGC GCCACCGCGC TCGCCGGCGG GGTCAATTTC GCCGTCTATT	240
CCGGCGGAGC CACCGCCGCG GCGCTCTGCC TCTTCACGCC AGAAGATCTC AAGGCGGTGG	300
GGTTGCCTCC CGAGTAGAGT TCATCAGCTT TGCCTGCGCC GCGCGCCCCT TTTTGGGCC	360
TGCAATTTAA GTTTGTACT GGGGCAAATG CTGCAGGATA GGGTGACCGA GGAGGTTCCC	420
CTTGACCCCC TGATGAATCG GACCGGGAAC GTGTGGCATG TCTTCATCGA AGGCGAGCTG	480
CACAACATGC TTTACGGGTA CAGGTTTCGAC GGCACCTTTG CTCCTCACTG CGGGCACTAC	540
CTTGATGTTT CCAATGTCGT GGTGGATCCT TATGCTAAGG CAGTGATAAG CCGAGGGGAG	600
TATGGTGTTT CAGCGCGTGG TAACAATTGC TGGCCTCAGA TGGCTGGCAT GATCCCTCTT	660
CCATATAGCA CGTTTGATTG GGAAGGCGAC CTACCTCTAA GATATCCTCA AAAGGACCTG	720

GTAATATATG	AGATGCACTT	GCGTGGATTG	ACGAAGCATG	ATTCAAGCAA	TGTAGAACAT	780
CCGGGTACTT	TCATTGGAGC	TGTGTCGAAG	CTTGACTATT	TGAAGGAGCT	TGGAGTTAAT	840
TGTATTGAAT	TAATGCCCTG	CCATGAGTTC	AACGAGCTGG	AGTACTCAAC	CTCTTCTTCC	900
AAGATGAACT	TTTGGGGATA	TTCTACCATA	AACTTCTTTT	CACCAATGAC	AAGATACACA	960
TCAGGCGGGA	TAAAAAACTG	TGGGCGTGAT	GCCATAAATG	AGTTCAAAAC	TTTTGTAAGA	1020
GAGGCTCACA	AACGGGGAAT	TGAGGTGATC	CTGGATGTTG	TCTTCAACCA	TACAGCTGAG	1080
GGTAATGAGA	ATGGTCCAAT	ATTATCATTT	AAGGGGGTCG	ATAATACTAC	ATACTATATG	1140
CTTGCAACCA	AGGGAGAGTT	TTATAACTAT	TCTGGCTGTG	GGAATACCTT	CAACTGTAAT	1200
CATCCTGTGG	TTCGTCAATT	CATTGTAGAT	TGTTTAAGAT	ACTGGGTGAC	GGAAATGCAT	1260
GTTGATGGTT	TTCGTTTTGA	TCTTGCATCC	ATAATGACCA	GAGGTTCCAG	TCTGTGGGAT	1320
CCAGTTAACG	TGTATGGAGC	TCCAATAGAA	GGTGACATGA	TCACAACAGG	GACACCTCTT	1380
GTTACTCCAC	CACTTATTGA	CATGATCAGC	AATGACCCAA	TTCTTGAGAG	CGTCAAGCTC	1440
ATTGCTGAAG	CATGGGATGC	AGGAGGCCTC	TATCAAGTAG	GTCAATTCCC	TCACTGGAAT	1500
TTTTGGTCTG	AGTGGAATGG	GAAGTACCGG	GACATTGTGC	GTCAATTCAT	TAAAGGCACT	1560
GATGGATTG	CTGGTGGTTT	TGCCGAATGT	CTTTGTGGAA	GTCCACACCT	ATACCAGGTA	1620
AGTTGTGGCA	ATACTTGTA	ATGAGTTGAG	TGAATGTCAC	CTGGATTTTT	TATATATACC	1680
ACATGATGAT	ACACATCTAA	ATATATAACA	ATCATAGTGT	ATGCATATGC	ATTTGGCTAA	1740
GAAGTATTAG	TGTATACACT	AGTGCTATAT	ATAGGTTTTA	ACACCCAACT	TGCCAATGAA	1800
GGAACATAGG	GCTTTCTAGT	TATCTTATTT	ATTTGTCCGG	TGAATAATCC	ACTGAAAAAT	1860
TCCAGCCATG	TCATTTTTTA	GGGGGGGAGA	AGAAACTATA	TTGATTTGCC	CCCCTAAAAG	1920
AAGCCATCTC	AGAATTCATA	GGTAAGTTGC	TTTTCTGTAA	AGAAAGGAAA	ACGACTTCAT	1980
ACTTTCTATC	GGTGCTAACT	TAGCTCGATG	TATATTTGTA	AGATGAATGC	CAAATTTAAT	2040
TTGTCGGATA	ATTTGATCTG	TTATTCACAA	ATTTCTATTT	GGTTTCTCTA	GAAATCAAAC	2100
CAGTAACTTG	TTATTGGCAC	TGCAACTTCT	TATTGATTAA	TCAGGCAGGA	GGAAGGAAAC	2160
CTTGGCACAG	TATCAACTTT	GTATGTGCAC	ATGATGGATT	TACACTGGCT	GATTTGGTAA	2220
CATATAATAA	GAAGTACAAT	TTACCAAATG	GGGAGAACAA	CAGAGATGGA	GAAAATCACA	2280
ATCTTAGCTG	GAATTGTGGG	GAGGAAGGAG	AATTCGCAAG	ATTGTCTGTC	AAAAGATTGA	2340

GGAAGAGGCA GATGCGCAAT TTCTTTGTTT GTCTCATGGT TTCTCAAGGA GTTCCAATGT 2400  
TCTACATGGG TGATGAATAT GGCCACACAA AAGGGGGCAA CAACAATACA TACTGCCATG 2460  
ATTCTTATGT CAATTATTTT CGCTGGGATA AAAAAGAACA ATACTCTGAG TTGCACCGAT 2520  
TCTGCTGCCT CATGACCAA TTCCGCAAGG AGTGCGAGGG TCTTGGCCTT GAGGACTTTC 2580  
CAACGGCCAA ACGGCTGCAG TGGCATGGTC ATCAGCCTGG GAAGCCTGAT TGGTCTGAGA 2640  
ATAGCCGATT CGTTGCCTTT TCCATGAAAG ATGAAAGACA GGGCGAGATC TATGTGGCCT 2700  
TCAACACCAG CCACTTACCG GCCGTTGTTG AGCTCCCAGA GCGCGCAGGG CGCCGGTGGG 2760  
AACC GG TGGT GGACACAGGC AAGCCAGCAC CATACTACTT CCTCACCGAC GACTTACCTG 2820  
ATCGCGCTCT CACCATACAC CAGTTCTCGC ATTTCTCTTA CTCCAACCTC TACCCCATGC 2880  
TCAGCTACTC ATCGGTCATC CTAGTATTGC GCCCTGATGT TTGAGAGACC AATATATACA 2940  
GTAAATAATA TGTCTATATG TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 2997

<210> 3  
<211> 764  
<212> PRT  
<213> Triticum aestivum L. cv. Florida  
<400> 3

Ser Gly Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala Thr Ala  
1 5 10 15  
Gly Lys Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Ala Ala Thr  
20 25 30  
Lys Val Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu Asp Arg  
35 40 45  
Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Ala Pro  
50 55 60  
Leu Gly Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val Tyr Ser  
65 70 75 80  
Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu Asp Leu  
85 90 95  
Lys Ala Asp Arg Val Thr Glu Glu Val Pro Leu Asp Pro Leu Met Asn  
100 105 110  
Arg Thr Gly Asn Val Trp His Val Phe Ile Glu Gly Glu Leu His Asn  
115 120 125

Met Leu Tyr Gly Tyr Arg Phe Asp Gly Thr Phe Ala Pro His Cys Gly  
 130 135 140

His Tyr Leu Asp Val Ser Asn Val Val Val Asp Pro Tyr Ala Lys Ala  
 145 150 155 160

Val Ile Ser Arg Gly Glu Tyr Gly Val Pro Ala Arg Gly Asn Asn Cys  
 165 170 175

Trp Pro Gln Met Ala Gly Met Ile Pro Leu Pro Tyr Ser Thr Phe Asp  
 180 185 190

Trp Glu Gly Asp Leu Pro Leu Arg Tyr Pro Gln Lys Asp Leu Val Ile  
 195 200 205

Tyr Glu Met His Leu Arg Gly Phe Thr Lys His Asp Ser Ser Asn Val  
 210 215 220

Glu His Pro Gly Thr Phe Ile Gly Ala Val Ser Lys Leu Asp Tyr Leu  
 225 230 235 240

Lys Glu Leu Gly Val Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe  
 245 250 255

Asn Glu Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Lys Met Asn Phe Trp Gly  
 260 265 270

Tyr Ser Thr Ile Asn Phe Phe Ser Pro Met Thr Arg Tyr Thr Ser Gly  
 275 280 285

Gly Ile Lys Asn Cys Gly Arg Asp Ala Ile Asn Glu Phe Lys Thr Phe  
 290 295 300

Val Arg Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Leu Asp Val Val  
 305 310 315 320

Phe Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe  
 325 330 335

Lys Gly Val Asp Asn Thr Thr Tyr Tyr Met Leu Ala Pro Lys Gly Glu  
 340 345 350

Phe Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn His Pro  
 355 360 365

Val Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu  
 370 375 380

Met His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met Thr Arg  
 385 390 395 400

Gly Ser Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro Ile Glu  
 405 410 415

Gly Asp Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Val Thr Pro Pro Leu Ile  
 420 425 430  
 Asp Met Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Gly Gly Val Lys Leu Ile Ala  
 435 440 445  
 Glu Ala Trp Asp Ala Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Gln Phe Pro His  
 450 455 460  
 Trp Asn Val Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Ile Val Arg  
 465 470 475 480  
 Gln Phe Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ala Gly Gly Phe Ala Glu Cys  
 485 490 495  
 Leu Cys Gly Ser Pro His Leu Tyr Gln Ala Gly Gly Arg Lys Pro Trp  
 500 505 510  
 His Ser Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp  
 515 520 525  
 Leu Val Thr Tyr Asn Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu Asn Asn  
 530 535 540  
 Arg Asp Gly Glu Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly  
 545 550 555 560  
 Glu Phe Ala Arg Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg  
 565 570 575  
 Asn Phe Phe Val Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Phe Tyr  
 580 585 590  
 Met Gly Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr  
 595 600 605  
 Cys His Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Glu Gln  
 610 615 620  
 Tyr Ser Glu Leu His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe Arg Lys  
 625 630 635 640  
 Glu Cys Glu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Lys Arg Leu  
 645 650 655  
 Gln Trp His Gly His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu Asn Ser  
 660 665 670  
 Arg Phe Val Ala Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile Tyr  
 675 680 685  
 Val Ala Phe Asn Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu Pro Glu  
 690 695 700

Arg Ala Gly Arg Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala  
705 710 715 720

Pro Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu Thr Ile  
725 730 735

His Gln Phe Ser His Phe Leu Tyr Ser Asn Leu Tyr Pro Met Leu Ser  
740 745 750

Tyr Ser Ser Val Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val  
755 760

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer  
>400> 4

AAAGGCCCAA TATTATCCTT TAGG

24

<210> 5  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer  
<400> 5

GCCATTTCAA CCGTTCTGAA GTCGGGAAGT C

31

<210> 6  
<211> 2437  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum L. cv. Florida  
<220>  
<222> CDS  
<223> (16) ... (2304)  
<400> 6

GAATTCGGCA CGAGG CCG GCG CCG CGC CTG CGA CGG TGG CGG CCC AAT GCG  
Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala  
1 5 10

51

ACG GCG GGG AAG GGG GTC GGC GAG GTC TGC GCC GCG GTT GTC GAG GTG  
Thr Ala Gly Lys Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Val

99

15	20	25	
GCG ACG AAG GCC GAG GAT GAG GGG GAG GAG GAC GAG CCG GTG GCG GAG Ala Thr Lys Ala Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu 30 35 40			147
GAC AGG TAC GCG CTC GGC GGC GCG TGC AGG GTG CTC GCC GGA ATG CCC Asp Arg Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro 45 50 55 60			195
ACG CCG CTG GGC GCC ACC GCG CTC GCC GGC GGG GTC AAT TTC GCC GTC Thr Pro Leu Gly Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val 65 70 75			243
TAC TCC GGC GGA GCC ACA GCC GCG GCG CTC TGC CTC TTC ACG CCA GAA Tyr Ser Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu 80 85 90			291
GAT CTC AAG GCG GAT AGG GTG ACG GAG GAG GTT CCC CTT GAC CCC CTG Asp Leu Lys Ala Asp Arg Val Thr Glu Glu Val Pro Leu Asp Pro Leu 95 100 105			339
ATG AAT CGG ACT GGG AAC GTA TGG CAT GTC TTC ATC GAA GGC GAG CTG Met Asn Arg Thr Gly Asn Val Trp His Val Phe Ile Glu Gly Glu Leu 110 115 120			387
CAG GAC ATG CTT TAC GGG TAC AGG TTC GAC GGC ACC TTT GCT CCT CAC Gln Asp Met Leu Tyr Gly Tyr Arg Phe Asp Gly Thr Phe Ala Pro His 125 130 135 140			435
TGC GGG CAC TAC CTT GAT GTT TCC AAT GTC GTG GTG GAT CCT TAT GCT Cys Gly His Tyr Leu Asp Val Ser Asn Val Val Val Asp Pro Tyr Ala 145 150 155			483
AAG GCA GTG ATA AGC CGA GGG GAG TAT GGT GTT CCG GCG CGT GGT AAC Lys Ala Val Ile Ser Arg Gly Glu Tyr Gly Val Pro Ala Arg Gly Asn 160 165 170			531
AAT TGC TGG CCT CAG ATG GCT GGC ATG ATC CCT CTT CCA TAT AGC ACG Asn Cys Trp Pro Gln Met Ala Gly Met Ile Pro Leu Pro Tyr Ser Thr 175 180 185			579
TTT GAT TGG GAA GGC GAC CTA CCT CTA AGA TAT CCT CAA AAG GAC CTG Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu Pro Leu Arg Tyr Pro Gln Lys Asp Leu 190 195 200			627
GTA ATA TAT GAG ATG CAC TTG CGT GGA TTC ACG AAG CAT GAT TCA AGC Val Ile Tyr Glu Met His Leu Arg Gly Phe Thr Lys His Asp Ser Ser 205 210 215 220			675
AAT GTA GAA CAT CCC GGT ACT TTC ATT GGG GCT GTG TCG AAG CTT GAC Asn Val Glu His Pro Gly Thr Phe Ile Gly Ala Val Ser Lys Leu Asp			723

225	230	235	
TAT TTG AAG GAG CTT GGA GTT AAT TGT ATT GAG TTA ATG CCC TGC CAT Tyr Leu Lys Glu Leu Gly Val Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His 240 245 250			771
GAG TTC AAC GAG CTG GAG TAC TCA ACC TCT TCT TCC AAG ATG AAC TTT Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Lys Met Asn Phe 255 260 265			819
TGG GGA TAT TCT ACC ATA AAC TTC TTT TCA CCA ATG ACG AGA TAC ACA Trp Gly Tyr Ser Thr Ile Asn Phe Phe Ser Pro Met Thr Arg Tyr Thr 270 275 280			867
TCA GGC GGG ATA AAA AAC TGT GGG CGT GAT GCC ATA AAT GAG TTC AAA Ser Gly Gly Ile Lys Asn Cys Gly Arg Asp Ala Ile Asn Glu Phe Lys 285 290 295 300			915
ACT TTT GTA AGA GAG GCT CAC AAA CGG GGA ATT GAG GTG ATC CTG GAT Thr Phe Val Arg Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Leu Asp 305 310 315			963
GTT GTC TTC AAC CAT ACA GCT GAG GGT AAT GAG AAT GGT CCA ATA TTA Val Val Phe Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu 320 325 330			1011
TCA TTT AGG GGG GTC GAT AAT ACT ACA TAC TAT ATG CTT GCA CCC AAG Ser Phe Arg Gly Val Asp Asn Thr Thr Tyr Tyr Met Leu Ala Pro Lys 335 340 345			1059
GGA GAG TTT TAT AAC TAT TCT GGC TGT GGG AAT ACC TTC AAC TGT AAT Gly Glu Phe Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn 350 355 360			1107
CAT CCT GTG GTT CGT CAA TTC ATT GTA GAT TGT TTA AGA TAC TGG GTG His Pro Val Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val 365 370 375 380			1155
ACG GAA ATG CAT GTT GAT GGT TTT CGT TTT GAT CTT GCA TCC ATA ATG Thr Glu Met His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met 385 390 395			1203
ACC AGA GGT TCC AGT CTG TGG GAT CCA GTT AAC GTG TAT GGA GCT CCA Thr Arg Gly Ser Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro 400 405 410			1251
ATA GAA GGT GAC ATG ATC ACA ACA GGG ACA CCT CTT GTT ACT CCA CCA Ile Glu Gly Asp Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Val Thr Pro Pro 415 420 425			1299
CTT ATT GAC ATG ATC AGC AAT GAC CCA ATT CTT GGA GGC GTC AAG CTC Leu Ile Asp Met Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Gly Gly Val Lys Leu			1347

430	435	440	
GTT GCT GAA GCA TGG GAT GCA GGA GGC CTC TAT CAA GTA GGT CAA TTC Val Ala Glu Ala Trp Asp Ala Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Gln Phe 445 450 455 460			1395
CCT CAC TGG AAT GTT TGG TCT GAG TGG AAT GGG AAG TAC CGG GAC ATT Pro His Trp Asn Val Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Ile 465 470 475			1443
GTG CGT CAA TTC ATT AAA GGC ACT GAT GGA TTT GCT GGT GGT TTT GCC Val Arg Gln Phe Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ala Gly Gly Phe Ala 480 485 490			1491
GAA TGT CTT TGT GGA AGT CCA CAC CTA TAC CAG GCA GGA GGA AGG AAA Glu Cys Leu Cys Gly Ser Pro His Leu Tyr Gln Ala Gly Gly Arg Lys 495 500 505			1539
CCT TGG CAC AGT ATC AAC TTT GTA TGT GCA CAC GAT GGA TTT ACA CTG Pro Trp His Ser Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu 510 515 520			1587
GCT GAT TTG GTA ACA TAT AAT AAC AAG TAC AAT TTA CCA AAT GGG GAG Ala Asp Leu Val Thr Tyr Asn Asn Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu 525 530 535 540			1635
AAC AAC AGA GAT GGA GAA AAT CAC AAT CTT AGC TGG AAT TGT GGG GAG Asn Asn Arg Asp Gly Glu Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu 545 550 555			1683
GAA GGA GAA TTC GCA AGA TTG TCT GTC AAA AGA TTG AGG AAG AGG CAG Glu Gly Glu Phe Ala Arg Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln 560 565 570			1731
ATG CGC AAT TTC TTT GTT TGT CTC ATG GTT TCT CAA GGA GTT CCA ATG Met Arg Asn Phe Phe Val Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met 575 580 585			1779
TTC TAC ATG GGT GAT GAA TAT GGC CAC ACA AAA GGG GGC AAC AAC AAT Phe Tyr Met Gly Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn 590 595 600			1827
ACA TAC TGC CAT GAT TCT TAT GTC AAT TAT TTT CGC TGG GAT AAA AAA Thr Tyr Cys His Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys 605 610 615 620			1875
GAA CAA TAC TCT GAC TTG CAC CGA TTC TGT TGC CTC ATG ACC AAA TTC Glu Gln Tyr Ser Asp Leu His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe 625 630 635			1923
CGC AAG GAG TGC GAG GGT CTT GGC CTT GAG GAT TTT CCA ACG GCC GAA Arg Lys Glu Cys Glu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Glu			1971

640						645						650														
CGG	CTG	CAG	TGG	CAT	GGT	CAT	CAG	CCT	GGG	AAG	CCT	GAT	TGG	TCT	GAG	2019										
Arg	Leu	Gln	Trp	His	Gly	His	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Asp	Trp	Ser	Glu											
655						660						665														
AAT	AGC	CGA	TTC	GTT	GCC	TTT	TCC	ATG	AAA	GAT	GAA	AGA	CAG	GGC	GAG	2067										
Asn	Ser	Arg	Phe	Val	Ala	Phe	Ser	Met	Lys	Asp	Glu	Arg	Gln	Gly	Glu											
670						675						680														
ATC	TAT	GTG	GCC	TTC	AAC	ACC	AGC	CAC	TTA	CCG	GCC	GTT	GTT	GAG	CTC	2115										
Ile	Tyr	Val	Ala	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Val	Val	Glu	Leu											
685						690						695						700								
CCG	GAG	CGC	ACA	GGG	CGC	CGG	TGG	GAA	CCG	GTG	GTG	GAC	ACA	GGC	AAG	2163										
Pro	Glu	Arg	Thr	Gly	Arg	Arg	Trp	Glu	Pro	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Lys											
705						710						715														
CCA	GCA	CCA	TAC	GAC	TTC	CTC	ACT	GAC	GAC	TTA	CCT	GAT	CGC	GCT	CTC	2211										
Pro	Ala	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Pro	Asp	Arg	Ala	Leu											
720						725						730														
ACC	ATA	CAC	CAG	TTC	TCT	CAT	TTC	CTC	AAC	TCC	AAC	CTC	TAC	CCC	ATG	2259										
Thr	Ile	His	Gln	Phe	Ser	His	Phe	Leu	Asn	Ser	Asn	Leu	Tyr	Pro	Met											
735						740						745														
CTC	AGC	TAC	TCA	TCG	GTC	ATC	CTA	GTA	TTG	CGC	CCT	GAT	GTT	TGAGAGGCGG		2311										
Leu	Ser	Tyr	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Pro	Asp	Val													
750						755						760														
ATATACAGTA						AATAATATGT						ATATATGTAG						TCCTTTGGCG	TATTATCAGT	GTGCACAATT	2371					
GCTCTATTGC						CAATGATCTA						TTCGATCCAC						AGATACATGT						GCAAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	2431
CTCGAG																			2437							
<210>						7																				
<211>						764																				
<212>						PRT																				
<213>						Triticum aestivum L. cv. Florida																				
<400>						7																				
Pro	Ala	Pro	Arg	Leu	Arg	Arg	Trp	Arg	Pro	Asn	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys											
1				5				10				15														
Gly	Val	Gly	Glu	Val	Cys	Ala	Ala	Val	Val	Glu	Val	Ala	Thr	Lys	Ala											
20								25								30										
Glu	Asp	Glu	Gly	Glu	Glu	Asp	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Asp	Arg	Tyr	Ala											
35								40								45										

15

Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Thr Pro Leu Gly  
 50 55 60

Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val Tyr Ser Gly Gly  
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu Asp Leu Lys Ala  
 85 90 95

Asp Arg Val Thr Glu Glu Val Pro Leu Asp Pro Leu Met Asn Arg Thr  
 100 105 110

Gly Asn Val Trp His Val Phe Ile Glu Gly Glu Leu Gln Asp Met Leu  
 115 120 125

Tyr Gly Tyr Arg Phe Asp Gly Thr Phe Ala Pro His Cys Gly His Tyr  
 130 135 140

Leu Asp Val Ser Asn Val Val Val Asp Pro Tyr Ala Lys Ala Val Ile  
 145 150 155 160

Ser Arg Gly Glu Tyr Gly Val Pro Ala Arg Gly Asn Asn Cys Trp Pro  
 165 170 175

Gln Met Ala Gly Met Ile Pro Leu Pro Tyr Ser Thr Phe Asp Trp Glu  
 180 185 190

Gly Asp Leu Pro Leu Arg Tyr Pro Gln Lys Asp Leu Val Ile Tyr Glu  
 195 200 205

Met His Leu Arg Gly Phe Thr Lys His Asp Ser Ser Asn Val Glu His  
 210 215 220

Pro Gly Thr Phe Ile Gly Ala Val Ser Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Glu  
 225 230 235 240

Leu Gly Val Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu  
 245 250 255

Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Lys Met Asn Phe Trp Gly Tyr Ser  
 260 265 270

Thr Ile Asn Phe Phe Ser Pro Met Thr Arg Tyr Thr Ser Gly Gly Ile  
 275 280 285

Lys Asn Cys Gly Arg Asp Ala Ile Asn Glu Phe Lys Thr Phe Val Arg  
 290 295 300

Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Leu Asp Val Val Phe Asn  
 305 310 315 320

His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe Arg Gly  
 325 330 335

Val Asp Asn Thr Thr Tyr Tyr Met Leu Ala Pro Lys Gly Glu Phe Tyr  
 340 345 350  
 Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn His Pro Val Val  
 355 360 365  
 Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu Met His  
 370 375 380  
 Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met Thr Arg Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro Ile Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Val Thr Pro Pro Leu Ile Asp Met  
 420 425 430  
 Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Gly Gly Val Lys Leu Val Ala Glu Ala  
 435 440 445  
 Trp Asp Ala Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Gln Phe Pro His Trp Asn  
 450 455 460  
 Val Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Ile Val Arg Gln Phe  
 465 470 475 480  
 Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ala Gly Gly Phe Ala Glu Cys Leu Cys  
 485 490 495  
 Gly Ser Pro His Leu Tyr Gln Ala Gly Gly Arg Lys Pro Trp His Ser  
 500 505 510  
 Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu Val  
 515 520 525  
 Thr Tyr Asn Asn Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu Asn Asn Arg Asp  
 530 535 540  
 Gly Glu Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly Glu Phe  
 545 550 555 560  
 Ala Arg Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn Phe  
 565 570 575  
 Phe Val Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Phe Tyr Met Gly  
 580 585 590  
 Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys His  
 595 600 605  
 Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Glu Gln Tyr Ser  
 610 615 620

17

Asp Leu His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe Arg Lys Glu Cys  
 625 630 635 640  
 Glu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Glu Arg Leu Gln Trp  
 645 650 655  
 His Gly His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu Asn Ser Arg Phe  
 660 665 670  
 Val Ala Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile Tyr Val Ala  
 675 680 685  
 Phe Asn Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu Pro Glu Arg Thr  
 690 695 700  
 Gly Arg Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala Pro Tyr  
 705 710 715 720  
 Asp Phe Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu Thr Ile His Gln  
 725 730 735  
 Phe Ser His Phe Leu Asn Ser Asn Leu Tyr Pro Met Leu Ser Tyr Ser  
 740 745 750  
 Ser Val Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val  
 755 760

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 8

GCTTTACGGG TACAGGTTTCG

20

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 9

GCTTTACGGG TACAGGTT

18

<210> 10  
 <211> 51

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer

<400> 10

GCGGTACCTC TAGAAGGAGA TATACATATG GCGGAGGACA GGTACGCGCT C

51

<210> 11  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer

<400> 11

GCTCGAGTCG ACTCAAACAT CAGGGCGCAA TAC

33

09/674817  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED 10

JUL 05 2001

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference 1998/M206 NP	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/03141	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)	Priority date (day/month/year) 08 May 1998 (08.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/56, 9/44, 15/82, 1/21, 5/10, A01H 5/00, 5/10, C08B 30/00		
Applicant AVENTIS CROPSCIENCE GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 12 November 1999 (12.11.99)	Date of completion of this report 10 August 2000 (10.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03141

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-45, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-24, filed with the letter of 28 July 2000 (28.07.2000),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☒ the claims, Nos. 13
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03141

### II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
  - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See supplemental sheet.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03141

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 14

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 14  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See supplemental sheet.

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03141

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The newly submitted set of claims does not have a Claim  
13.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03141

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I I

The priority document includes only the sequences  
corresponding to SEQ ID numbers 1 to 5.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03141

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claim 14 refers to Claim 13, which no longer exists. The claim is therefore so unclear that no evaluation of novelty or inventive step can be conducted.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03141

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 5, 8-12, 15-24	YES
	Claims	1-3, 6, 7	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12, 15-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12, 15-24	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1. The present application discloses nucleic acid molecules that code for an isoamylase isolated from wheat, as well as the corresponding proteins.
2. The International Preliminary Examining Authority is of the opinion that the subject matter of Claims 1 to 3, 6 and 7 is not novel (**PCT Article 33(2)**).

Claims 1 to 3, 6 and 7 pertain to nucleic acid molecules that include at least one part of the sequence defined in SEQ ID No.2.

The sugaryl isoamylase known from D1 (James et al., The Plant Cell, Vol. 7, April 1995, pages 417 to 429), being almost 85% identical to the sequence having SEQ ID No. 2, clearly includes parts of SEQ ID No. 2 (sections having over 20 consecutive identical nucleotides). Therefore the nucleic acid coding for sugaryl comes under the definition of Claims 1 to 3, 6 and 7.

It should also be noted that the origin of the isoamylase (from wheat) is not what differentiates the protein from the isoamylases known from the

prior art. A nucleic acid molecule is characterized by the sequence, and an enzyme can be characterized by its enzymatic characteristics or, likewise, by its amino acid sequence. The organism from which the enzyme or the nucleic acid that codes therefor was isolated appears to have particular significance only when the enzyme demonstrates characteristics that an enzyme isolated from a different organism would not demonstrate.

3. The subject matter of Claims 1 to 12 and 14 to 24 appears to lack an inventive step as per **PCT Article 33(3)**.

Plant isoamylases are known from the prior art. In order to isolate a new isoamylase from a plant, a person skilled in the art would use one of the previously known sequences and would take a sample of a cDNA bank with this heterologous sample. Thus a person skilled in the art would be able to isolate the isoamylase from wheat without being inventive.

The subject matter of Claims 2 to 12 and 15 to 24 could only be recognized as involving an inventive step if the identification of the isoamylase from wheat involved an inventive step.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03141

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "homology" is not clear. Two sequences are either homologous or not, but homology is not quantifiable. The two quantifiable values used in sequence comparisons are similarity and identity.

Based on the description (page 8, first section), the expression "homology of over 90%" was interpreted as "sequence identity of at least 90%".

REFUSED BY  
EPA AMBIT

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 15 AUG 2000

WIPO PCT



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/M206 NP	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03141	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/05/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/05/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/56		
Anmelder AVENTIS CROPSOURCE GMBH		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragt Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dies r Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
  - ☒ Grundlage des Berichts
  - ☒ Priorität
  - ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
  - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
  - ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
  - ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
  - ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
  - ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  12/11/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  10.08.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Bilanz, J  Tel. Nr. +49 89 2399 8707 

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/03141

## I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-45                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-24                      eingegangen am                      02/08/2000    mit Schreiben vom                      28/07/2000

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,                      Seiten:  
☒ Ansprüche,                      Nr.:                      13  
☐ Zeichnungen,                      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzlich Bemerkungen:

siehe B iblatt

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 14.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 14 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):  
siehe Beiblatt
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	4, 5, 8-12, 15-24
	Nein: Ansprüche	1-3, 6, 7
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-12, 15-24
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-12, 15-24
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**

siehe B iblatt

**VIII. Bestimmt Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**Bemerkungen zu Punkt I**

Der neu eingereichte Anspruchsatz hat keinen Anspruch 13.

**Bemerkungen zu Punkt II**

Das Prioritätsdokument umfasst nur die Sequenzen entsprechend den SEQ ID Nummern 1-5.

**Bemerkungen zu Punkt III**

Anspruch 14 bezieht sich auf den nicht mehr vorhandenen Anspruch 13. Der Anspruch ist daher so unklar, dass keine Meinung zu Neuheit und erfinderischer Tätigkeit dieses Anspruchs gegeben werden kann.

**Bemerkungen zu Punkt V**

1. Die vorliegende Anmeldung offenbart Nukleinsäuremoleküle, welche für eine aus Weizen isolierte Isoamylase kodieren, sowie die entsprechenden Proteine.
2. Die mit der Internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde ist der Auffassung, dass der Gegenstand der Ansprüche 1-3, 6, und 7 nicht neu ist (**Artikel 33(2) PCT**).

Die Ansprüche 1-3, 6 und 7 betreffen Nukleinsäuremoleküle, welche mindestens einen Teil der unter SEQ ID No. 2 dargestellten Sequenz umfassen.

Die aus D1 (James et al., The Plant Cell, Bd. 7, April 1995, S. 417-429) bekannte sugary1 Isoamylase, welche zu beinahe 85% identisch ist zu der Sequenz mit der SEQ ID No. 2, umfasst offensichtlich Teile der SEQ ID No. 2 (Abschnitte mit über 20 aufeinanderfolgenden identischen Nukleotiden). Die für sugary1 kodierende Nukleinsäure fällt damit unter die Definition der Ansprüche 1-3, 6 und 7.

Es sollte ebenfalls beachtet werden, dass die Herkunft der Isoamylase (aus Weizen) das Protein nicht von den im Stand der Technik bekannten Isoamylasen unterscheidet. Ein Nukleinsäuremolekül ist charakterisiert durch die Sequenz, und

ein Enzym kann charakterisiert werden durch seine enzymatischen Eigenschaften oder ebenfalls durch seine Aminosäuresequenz. Der Organismus, aus welchem das Enzym beziehungsweise die dafür kodierende Nukleinsäure isoliert wurde, scheint nur dann von besonderer Bedeutung zu sein, wenn das Enzym Eigenschaften aufweist, welche ein aus einem anderen Organismus isoliertes Enzym nicht aufweisen würde.

3. Der Gegenstand der Ansprüche 1-12 und 15-24 scheint nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von **Artikel 33(3) PCT** zu beruhen.

Pflanzliche Isoamylasen sind im Stand der Technik bekannt. Um eine neue Isoamylase aus einer Pflanze zu isolieren, würde der Fachmann eine der bereits bekannten Sequenzen verwenden und eine cDNA Bank mit dieser heterologen Probe durchmustern. Der Fachmann ist also in der Lage, die Isoamylase aus Weizen ohne die Anwendung einer erfinderischen Tätigkeit zu isolieren.

Den Gegenständen der Ansprüche 212 und 15-24 könnte nur dann eine erfinderische Tätigkeit zuerkannt werden, wenn die Identifikation der Isoamylase aus Weizen auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhen würde.

**Bemerkungen zu Punkt VII**

Der Ausdruck "Homologie" ist nicht klar. Zwei Sequenzen sind entweder homolog, oder sie sind es nicht, Homologie ist aber keine quantifizierbare Grösse. Die beiden in Sequenzvergleichen angewendeten quantifizierbaren Grössen sind Ähnlichkeit und Identität.

Gestützt auf die Beschreibung (S. 8, 1. Abschnitt) wurde der Begriff "Homologie von über 90%" als "Sequenzidentität von mindestens 90%" interpretiert.

Patentansprüche:

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - (a) einem Nucleinsäuremolekül, das ein Protein codiert, das die unter Seq ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt,
  - (b) einem Nucleinsäuremolekül, das die unter Seq ID No. 2 dargestellte Nucleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt oder eine hierzu korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
  - (c) einem Nucleinsäuremolekül, das mit einem der unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäuremoleküle hybridisiert oder komplementär dazu ist, und
  - (d) einem Nucleinsäuremolekül, dessen Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz eines unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküls abweicht,wobei das unter (a), (c) und (d) genannte Nucleinsäuremolekül eine Homologie von über 90% mit Seq ID No. 2 aufweist.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein DNA-Molekül ist.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es ein cDNA-Molekül ist.
4. Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, das regulatorische Elemente enthält.
5. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein RNA-Molekül ist.

6. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5 hybridisiert und mit Seq ID No. 2 eine Homologie von über 90% aufweist.

5

7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotiden ist.

8. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

10

9. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

15

10. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Synthese einer nicht-translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

20

11. Vektor nach Anspruch 8, worin besagtes Nucleinsäuremolekül in antisense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Synthese einer nicht-translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

25

12. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11 transformiert ist oder die von einer solchen Zelle abstammt.

30

14. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach Anspruch 13, worin eine Wirtszelle nach Anspruch 12 unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des besagten Proteins erlauben und besagtes Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.
- 5
15. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, worin
- a) ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder
- b) ein Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11
- 10 in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert wird.
16. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 oder einem oder mehreren Vektor nach Anspruch 8 bis 11 transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle
- 15 abstammt.
17. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, worin
- a1) ein Nucleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder
- 20 a2) ein Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11 in das Genom einer pflanzlichen Zelle integriert wird und
- b) eine vollständige Pflanze aus besagter Pflanzenzelle regeneriert wird.
18. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 16.
- 25
19. Pflanze nach Anspruch 18, die eine Nutzpflanze ist.
20. Pflanze nach Anspruch 19, die eine stärke-speichernde Pflanze ist.
- 30 21. Pflanze nach Anspruch 20, die eine monokotyle Pflanze oder Mais ist.

22. Pflanze nach Anspruch 21, die eine Gersten, Roggen oder Weizenpflanze ist.

23. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der  
5 Ansprüche 18 bis 22.

24. Verwendung einer Pflanzenzelle nach Anspruch 16, einer Pflanze nach einem  
oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22 oder von Vermehrungsmaterial nach  
Anspruch 23 zur Herstellung von Stärke.

10

We claim:

1. A nucleic acid molecule encoding a protein with the function of a wheat isoamylase, selected from the group consisting of
  - 5 (a) a nucleic acid molecule encoding a protein comprising an amino acid sequence shown under Seq ID No. 3 or Seq ID No. 7,
  - (b) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence shown under Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 or Seq ID No. 6 or a part thereof or a ribonucleotide sequence corresponding hereto;
  - 10 (c) a nucleic acid molecule which hybridizes with a nucleic acid molecule mentioned under (a) or (b) or is complementary thereto, and
  - 15 (d) a nucleic acid molecule whose nucleotide sequence deviates from the sequence of a nucleic acid molecule mentioned under (a), (b) or (c) owing to the degeneracy of the genetic code.
- 20 2. A nucleic acid molecule as claimed in claim 1, which is a DNA molecule.
3. A DNA molecule as claimed in claim 2, which is a cDNA molecule.
- 25 4. A nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 3 containing regulatory elements.
5. A nucleic acid molecule as claimed in claim 1, which is an RNA molecule.
- 30 6. A nucleic acid molecule which specifically hybridizes with a nucleic acid molecule as claimed in any of claims 1 to 5.
7. A nucleic acid molecule as claimed in claim 6 which, is an oligonucleotide with a length of at least 15 nucleotides.
- 35 8. A vector containing a DNA molecule as claimed in any of claims 1 to 5.

9. A vector as claimed in claim 8, wherein said nucleic acid molecule is linked in sense orientation to regulatory elements which ensure transcription and synthesis of a translatable RNA in pro- or eukaryotic cells.
- 5 10. A vector as claimed in claim 8, wherein said nucleic acid molecule is linked in sense orientation to regulatory elements which ensure the synthesis of an untranslatable RNA in pro- or eukaryotic cells.
- 10 11. A vector as claimed in claim 8, wherein said nucleic acid molecule is linked in antisense orientation to regulatory elements which ensure the synthesis of an untranslatable RNA in pro- or eukaryotic cells.
- 15 12. A host cell which is transformed with a nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 5 or a vector as claimed in one or more of claims 8 to 11 or which is derived from such a cell.
- 20 13. A protein encoded by a nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 4.
- 25 14. A process for the preparation of a protein as claimed in claim 13, wherein a host cell as claimed in claim 12 is cultured under conditions which permit said protein to be synthesized and said protein is isolated from the cultured cells and/or the culture medium.
- 30 15. A process for generating a transgenic plant cell, wherein  
a) a nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 5 or  
b) a vector as claimed in one or more of claims 8 to 11  
is integrated into the genome of a plant cell.
- 35 16. A transgenic plant cell which has been transformed with a nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 5 or a vector as claimed in one or more claim 8 to 11 or which is derived from such a cell.
17. A process for generating a transgenic plant cell, wherein  
a1) a nucleic acid molecule as claimed in one or more of claims 1 to 5 or

- a2) a vector as claimed in one or more of claims 8 to 11  
is integrated into the genome of a plant cell and  
b) an intact plant is regenerated from said plant cell.

- 5    18.    A plant containing a plant cell as claimed in claim 16.
19.    A plant as claimed in claim 19, which is a monocotyledonous or  
              dicotyledonous plant.
- 10    20.    A plant as claimed in claim 19, which is a crop plant.
21.    A plant as claimed in claim 20, which is a starch-storing plant.
22.    A plant as claimed in claim 21, which is a maize, rice, potato or  
15           wheat plant.
23.    A propagation material of a plant as claimed in one or more of  
              claims 18 to 22.
- 20    24.    A starch obtainable from a plant cell as claimed in claim 16, a plant  
              as claimed in one or more of claims 18 to 22 or from propagation  
              material as claimed in claim 23.
25.    The use of the starch as claimed in claim 24 for the production of  
25           finished or unfinished foodstuffs, preferably baked goods or pasta.
26.    The use of the starch as claimed in claim 24 for the production of  
              packaging materials or disposable articles.

**AgrEvo**  
- Datenerfassung -  
Eingabe: 26.11.99  
von: mg

PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/58690  
PCT/EP99/03141

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To: HOECHST SCHERING AGREVO GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNE

Eing. 26. NOV. 1999

☐ W.V.  
☐ ablegen  
☐ von wie vord. angegeben

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 18 November 1999 (18.11.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 1998/M206 NP			
International application No. PCT/EP99/03141	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)	Priority date (day/month/year) 08 May 1998 (08.05.98)	
Applicant HOECHST SCHERING AGREVO GMBH et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CU,CZ,EA,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,KG,KZ,LC,LK,LR,  
LT,LV,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
18 November 1999 (18.11.99) under No. WO 99/58690

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

GR

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

T :

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 27 March 2000 (27.03.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1998/M206 NP	
International application No. PCT/EP99/03141	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

## Name and Address

HOECHST SCHERING AGREVO GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069-305-82808

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☒ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

## Name and Address

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

Hoechst Schering Agrevo GmbH

Patent- und Lizenzabteilung K 801

Vorg.

Empf. 07. APR. 2000

☐ WW☐ ablegen☐ Verz. wie Vorg. / enclosed.

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069-305-82808

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

Please also note the change of name in the correspondence address.

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ ther:
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colmbettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

G. Bähr

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) 1998/M206 NP

### Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Hoechst Schering AgrEvo GmbH  
Miraustraße 54  
D-13509 Berlin  
Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.: 069-305-82808

Telefaxnr.: 069-305-2200

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LÖRZ, Horst  
Ramckeweg 6a  
22589 Hamburg  
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter...

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Hoechst Schering AgrEvo GmbH  
Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
Deutschland

Telefonnr.: 069-305-82808

Telefaxnr.: 069-305-2200

Fernschreibnr.:

☒ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt der gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

*Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.*

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LÜTTICKE, Stephanie  
Lange Reihe 22  
20099 Hamburg  
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder  
☒ Anmelder und Erfinder  
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ABEL, Gernot  
Papendamm 28  
20146 Hamburg  
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder  
☒ Anmelder und Erfinder  
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

GENSCHEL, Ulrich  
Eimsbütteler Str. 100b  
22769 Hamburg  
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder  
☒ Anmelder und Erfinder  
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder  
☐ Anmelder und Erfinder  
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angeben.

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

**Regionales Patent**

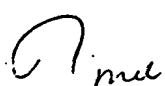
- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

**Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):**

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien .....                          | <input type="checkbox"/> LS Lesotho .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen .....   |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich .....                                   | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina .....               | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien ..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien .....                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen .....  |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein .....             | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba .....                              | <input type="checkbox"/> PT Portugal .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik .....             | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien .....  |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....                            |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark .....                                     | <input type="checkbox"/> SD Sudan .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland .....                           | <input type="checkbox"/> SE Schweden .....   |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien .....                                      | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur .....  |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien .....                                       |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....                                   |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana .....  | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....                                    |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia .....                                       | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien .....                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .....                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien .....                            | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....                                     |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia .....  | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....                       |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea ..... |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea .....                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....                        |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte arabische Emirate .....                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika .....                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia .....                           | <input type="checkbox"/> .....   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH</b>					<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:			
		national Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt	
Zeile (1) 08. Mai 1998 08.05.98	198 20 608.9	DE			
Zeile (2)					
Zeile (3)					
<input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist) <i>* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.</i>					
<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b>					
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr)      Aktenzeichen      Staat (oder regionales Amt)			
ISA /					
<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE</b>					
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern: Antrag : 4 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 45 Ansprüche : 4 Zusammenfassung : 1 Zeichnungen : Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 18 <b>Blattzahl insgesamt : 72</b>		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht 3. <input checked="" type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 36963 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift 5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: 7. <input checked="" type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material 8. <input checked="" type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren in computerlesbarer Form 9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):			
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:			
<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>					
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.					
<div style="text-align: center; font-size: 2em; margin-bottom: 10px;">  </div> <div>             Dr. Hans Christoph Rippel              (AV-Nr. 36963)           </div>					

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind):      ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

# VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>1998/M206 NP</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 03141</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>07/05/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>08/05/1998</b>
Anmelder  <b>HOECHST SCHERING AGREVO GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03141

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/56 C12N9/44 C12N15/82 C12N1/21 C12N5/10  
A01H5/00 A01H5/10 C08B30/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 03513 A (MONSANTO CO) 8. Februar 1996 (1996-02-08) Zusammenfassung; Ansprüche 17,24 ---	24-26
P, X	WO 99 14314 A (GOODMAN FIELDER LTD ; LI ZHONGYI (AU); MORELL MATTHEW (AU); RAHMAN) 25. März 1999 (1999-03-25) Sequenz No. 16 Beispiel 23 --- -/--	1-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X ✓	JAMES M G ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE MAIZE GENE SUGARY1, A DETERMINANT OF STARCHCOMPOSITION IN KERNELS" PLANT CELL,US,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, Bd. 7, Seite 417-429 XP002033602 ISSN: 1040-4651 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-26
X ✓	JAMES ET AL: "Zea mays Sulp (Sugary1) mRNA, partial cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE, U18908, 19. April 1995 (1995-04-19), XP002084161 das ganze Dokument -----	1-26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9603513 A	08-02-1996	AU 691325 B	14-05-1998
		AU 3143795 A	22-02-1996
		CA 2195786 A	08-02-1996
		EP 0772683 A	14-05-1997
		HU 77745 A	28-07-1998
		JP 10504453 T	06-05-1998
		PL 318354 A	09-06-1997
		US 5750876 A	12-05-1998
WO 9914314 A	25-03-1999	AU 8967098 A	05-04-1999